

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 03175355 A

(43) Date of publication of application: 30.07.91

(51) Int. Cl
G01N 30/72
G01N 27/62
G01N 30/26

(21) Application number: 02225906

(22) Date of filing: 28.08.90

(30) Priority: 12.09.89 JP 01236683

(71) Applicant: EISAI CO LTD

(72) Inventor:
ASAKAWA NAOKI
OE HIROSHI
YOSHIDA YUTAKA
SATO TADASHI
NEZU MASAO
ODA YOSHIYA

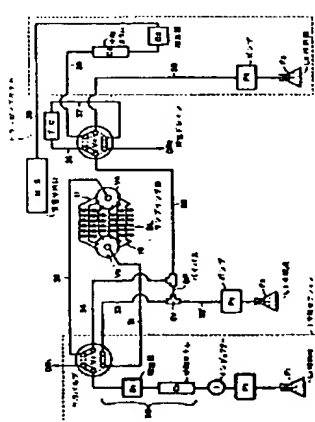
(54) METHOD AND APPARATUS FOR CONVERTING
MOBILE PHASE IN HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS ANALYSIS

(57) Abstract:

PURPOSE: To freely select the mobile phase optimum to a component to be separated by separating the component in a sample by high performance liquid chromatography and subsequently diluting the mobile phase to catch only the component.

CONSTITUTION: A sample passes through a separation column C_1 along with a mobile phase L_1 to be separated into individual components which are, in turn, monitored by a detector D_1 . Subsequently, the individual components in the mobile phase L_1 are sent in a sampling part SL to be respectively stored in predetermined loops 11, 12.... A pump P_3 is operated in this state to send the mobile phase dilution liquid L_3 in a container F_3 in the sampling part SL and the components are extruded along with the mobile phase L_1 to be sent in a trapping column TC to be trapped. The components gathered in the column TC are sent in a mass analyser MS through a line 36, a six-way valve V_4 and a line 39 for the sake of analysis by changing over the six-way valve V_4 to send the mobile phase L_1 in a line 38 by a pump P_3 and sending the mobile phase in the column TC in the reverse direction from a line 37 through the valve V_4 .

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio



BEST AVAILABLE COPY

⑫ 公開特許公報(A)

平3-175355

⑮ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)7月30日

G 01 N 30/72
27/62
30/26C 7621-2G
X 7529-2G
A 7621-2G

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全13頁)

⑭ 発明の名称 高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法と装置

⑰ 特 願 平2-225906

⑱ 出 願 平2(1990)8月28日

優先権主張 ⑲ 平1(1989)9月12日 ⑳ 日本(JP) ㉑ 特願 平1-236683

⑳ 発 明 者	浅 川 直 樹	茨城県つくば市並木3丁目26-13
㉑ 発 明 者	大 江 浩 志	茨城県つくば市千現2-8-3
㉒ 発 明 者	吉 田 豊	埼玉県本庄市本庄4-5-18
㉓ 発 明 者	里 忠	千葉県我孫子市つくし野7-20-10
㉔ 発 明 者	根 津 征 夫	茨城県北相馬郡守谷町久保ヶ丘3-7-2
㉕ 発 明 者	小 田 吉 哉	茨城県つくば市春日3丁目5番地1 つくばね寮202号室
㉖ 出 願 人	エーザイ株式会社	東京都文京区小石川4丁目6番10号
㉗ 代 理 人	弁理士 渡 辺 勤	外1名

明 細 書

1. 発明の名称

高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法と装置

2. 特許請求の範囲

(1) 高速液体クロマトグラフィーにより試料中の成分を分離後移動相を希釈してトラッピングカラムで成分のみを捕捉して、該成分を新たな移動相で質量分析計に送ることを特徴とする高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法。

(2) 高速液体クロマトグラフィーにより試料中の成分を分離するセクションと成分を質量分析計に導入するセクションとを設け、これら両セクションの間に希釈液の挿入ラインと、希釈された移動相は通すが成分は捕捉するトラッピングカラムを配設した高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(3) 高速液体クロマトグラフィーにより試料中の成分を分離するセクションと成分を質量分析

計に導入するセクションとを設けると共に、これら両セクションの間には分離した成分を成分毎に異なるループに貯溜するサンプリング部と、該サンプリング部に希釈液を挿入するラインと、希釈された移動相は通すが成分は捕捉するトラッピングカラムを配設した高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(4) 請求項(3)の変換装置において、サンプリング部からトラッピングカラムの間のラインに希釈液を注入する移動相希釈バイパスを設け、かつ、該移動相希釈バイパスからの希釈液の送液量を変えられるように構成して移動相の希釈率を調節自在にした高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(5) 成分を質量分析計に導入するセクションに分離カラムを配設した請求項(2)乃至(4)の何れかに記載の高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、高速液体クロマトグラフィー質量分析において、分離・分取を目的とする成分に応じた移動相と成分（物質を含む）を質量分析計に導入可能な移動相を自由に換えられるように構成した、高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法と装置に関するものである。

（従来の技術）

従来の高速液体クロマトグラフィー質量分析は第14図のように行われている。即ち、（F）は移動相（L）が入った容器、（P）はポンプ、（I）は分析する試料を注入するインジェクター、（C）は分離カラム、（D）は検出器、（MS）は質量分析計であって、これらは送液用のラインでつながれている。

そして、ポンプ（P）で送液された移動相（L）は、インジェクター（I）から注入された試料と共に分離カラム（C）に送り込まれ、ここで試料中に含有される複数個の成分が個々に分離され、次いで質量分析計（MS）に導入

されるようになっている。質量分析計（MS）に導入される成分の存在は検出器（D）で予め検出されるようになっている。

質量分析計（MS）では、その導入部において先ず移動相（L）を除去すると同時に目的とする成分をイオン化して分析するのであるが、除去手段やイオン化の手段にはいくつかの方式があり、その方式によって使用可能な移動相、分析可能な成分が制限されている。

その方式には例えばスプレー方式（サーモスプレー法、大気圧スプレー法、パーティクルビーム法）、フリットFAB方式、その他がある。（発明が解決しようとする課題）

しかしながら、従来のものには以下の問題がある。

① サーモスプレー方式の場合、イオン化には電解質の存在が不可欠であり、高速液体クロマトグラフィー質量分析での移動相にはバッファを用いる必要がある。しかし用いるバッファについては酢酸バッファなどの不揮発性バ

ッファは質量分析計の導入部の金属ノズルにバッファ成分が析出し、質量分析が不可能になる。このため、高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相には酢酸アンモニウムなどの揮発性バッファを用いなければならず、分離される成分が極めて制限されてしまう。

② フリットFAB方式の場合、イオン化に必要なマトリックス、例えばグリセロール、エチレンジアミンなどを移動相に添加するが、このマトリックスの種類によっては分離される成分が極めて制限されてしまう。また、用いる移動相のバッファが質量分析計に直接入るためイオン化を抑制しないものに限られるので、サーモスプレー方式と同様に高速液体クロマトグラフィー質量分析において分離される成分が極めて制限されてしまう。

従って、現在は、高速液体クロマトグラフィー質量分析が可能な成分は、移動相にバッファを用いなくて分離できる中性物質とか例えば酢酸アンモニウムのような揮発性バッファの

移動相で分離可能な一部のイオン性成分（酸性、塩基性化合物）が対象となっていて極めて限定されている。特に、医薬品に使われる化合物においては、イオン性化合物が比較的多いので、従来の高速液体クロマトグラフィー質量分析では対応できないことが多い。

（課題を解決するための手段）

そこで、以上の技術的課題を解決するため以下のような手段を構成した。

(1) 高速液体クロマトグラフィーにより試料中の成分を分離後移動相を希釈してトラッピングカラムで成分のみを捕捉して、該成分を新たな移動相で質量分析計に送ることを特徴とする高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換方法。

(2) 高速液体クロマトグラフィーにより試料中の成分を分離するセクションと成分を質量分析計に導入するセクションとを設け、これら両セクションの間に希釈液の挿入ラインと、希釈された移動相は通すが成分は捕捉するトラッピン

グラムを配設した高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(3) 高速液体クロマトグラフィーにより試料中の成分を分離するセクションと成分を質量分析計に導入するセクションとを設けると共に、これら両セクションの間には分離した成分を成分毎に異なるループに貯溜するサンプリング部と、該サンプリング部に希釈液を挿入するラインと、希釈された移動相は通すが成分は捕捉するトラッピングカラムを配設した高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(4) (3)の変換装置において、サンプリング部からトラッピングカラムの間のラインに希釈液を注入する移動相希釈バイパスを設け、かつ、該移動相希釈バイパスからの希釈液の送液量を変えられるように構成して移動相の希釈率を調節自在にした高速液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(5) 成分を質量分析計に導入するセクションに分離カラムを配設した上記(2)乃至(4)の高速

液体クロマトグラフィー質量分析における移動相の変換装置。

(作用)

以上の構成からなる本発明によれば、試料中の成分を分離した後成分のみを捕捉して、該成分を新たな移動相で質量分析計に送るようにしたことにより、成分を分離するのに成分に応じた最適な移動相を選択でき、従来は高速液体クロマトグラフィー質量分析が不可能だった物質の分析ができるようになる。

(実施例)

以下、本発明の実施例を説明する。

第1図において、(1)は高速液体クロマトグラフィーの分離セクションである。(F₁)は目的の成分を分離するための移動相(L₁)を入れた容器であり、移動相(L₁)は目的の成分を分離するのに最適なバッファーなどを適宜選択して使用する。

(P₁)はポンプ、(I)はインジェクター、(C₁)は分離カラム、(D₁)は検出器、(V₁)

はラインの切り替えを行う六方バルブであり、(D R₁)は不要な成分を移動相と共に排出する排出ドレインであって、これらはステンレス管等からなるラインで接続されている。

第2図は六方バルブ(V₁)によって行われるラインの切り替え状態を示しており、図示しないコックを操作することにより、六方バルブ(V₁)に接続されている経路が実線(x)で示すものと点線(y)で示すものに交互に切り替わるようになっている。

第1図において、(2)はセクション(1)で分離した成分を質量分析計(MS)に送るセクションであり、(F₂)は移動相(L₂)を入れた容器である。移動相(L₂)には後述するトラッピングカラム(TC)より成分を溶出させるのに必要な揮発性バッファーやマトリックスを含む移動相を使用し、例えばメタノール或はアセトニトリルと酢酸バッファーなどの混合液を使用できるが、移動相は物質に合わせて適宜選択する。

(P₂)はポンプ、(C₂)は分離カラム、(D₂)は検出器である。これら分離セクション

(1)と質量分析計導入セクション(2)の間において、(F₃)は移動相希釈液(L₃)が充填された容器、(P₃)はポンプ、(BP)は移動相希釈バイパス、(SL)はサンプリング部、(V₂)(V₃)はサンプリング部(SL)のループを切り換える切り換えバルブである。なお、移動相希釈バイパス(BP)から送液される希釈液(L₃)の流量は調節できるようになっている。

第3図に示すようにサンプリング部(SL)には多数のループ(11)(12)…が装置されており、切り換えバルブ(V₂)(V₃)を切り換えて移動相の通る経路を任意のループに選択できるようになっている。こうして、分離セクション(1)で分離した成分を成分毎に異なるループ(11)(12)…に分けて貯溜できるようになっている。なお、実施例では6個のループ(11)～(16)が設けられているがル

ープの数は任意に設定でき、例えば切り換えバルブを増設してループの数を更に増やすこともできる。

(V₁)はラインの切り換えを行う六方バルブ、(DR₂)は排出ドレイン、(TC)はトラッピングカラムである。六方バルブ(V₁)は先に第2図で説明したものと同じようにして経路を切り換えられるものである。トラッピングカラム(TC)は目的成分を吸着できるように、分離カラム(C₂)と同じモードのカラムを使用するが、必ずしも高速液体クロマトグラフィー用のものでなくてもある程度の耐圧性のあるカラムであれば使用できる。またカラム(C₁)とカラム(C₂)は例えば順相、逆相、イオン交換、ゲル化クロマト(GPC)、疎水クロマト、アフィニティー、光学分割クロマトなどのモードのカラムを分離分析しようとする物質に合わせて適宜選択する。

次に、以上のように構成された装置を使用して移動相を変換する手段を説明する。

バルブ(V₁)を切り換えてライン(33)とライン(31)を連通させる。

この状態でポンプ(P₂)を稼働して容器(F₂)中の移動相希釈液(L₂)をライン(33') (33)、バルブ(V₁)及びライン(31)からサンプリング部(SL)に送り込み、成分を移動相(L₁)と共に押しだしてライン(32)、バルブ(V₁)及びライン(34)(35)を通してトラッピングカラム(TC)に送り込んで、トラッピングカラム(TC)で成分を捕捉する。

また、この場合、移動相希釈バイパス(BP)から移動相希釈液(L₂)を適量送液しながら、移動相の希釈率を調節して成分をトラッピングカラム(TC)に送り込むようにすることにより、トラッピングカラム(TC)で成分を捕捉し易いようにする。即ち、トラッピングカラム(TC)で捕捉され易い移動相の希釈率は、成分の種類によりそれぞれ異なるのであるが、このように移動相希釈バイパス(BP)から移動相希釈液(L₂)を適量注入して移動相

説明のため、各部分を結んでいるラインを第1図のように(30)~(39)と定義する。

まず、ポンプ(P₁)を稼働して移動相(L₁)をライン(30)に送り込み、インジェクター(I)から試料を注入する。

試料は移動相(L₁)と共に分離カラム(C₁)を通過し、ここで試料中に含有されている個々の成分に分離され、分離された各成分は検出器(D₁)でモニターされる。

次いで、移動相中の個々の成分は六方バルブ(V₁)を介してライン(31)を通り、サンプリング部(SL)に送り込まれ、ここで切り換えバルブ(V₂)(V₃)によってそれぞれ所定のループ(11)(12)…に貯溜される。

なお、バルブ(V₂)(V₃)の切り換えは試料中に含有されている個々の成分がそれぞれ異なるループに貯溜できるように、検出器(D₁)の検出信号に応じて行われる。

以上のようにしてループに適量の成分が集まった後、ポンプ(P₁)の稼働を停止し、六方

の希釈率を成分に応じた値に調節してやると、成分がトラッピングカラム(TC)で捕捉されやすくなるのである。

なお、ポンプ(P₂)によってライン(33')から送られた希釈液(L₂)はバイパス(BP)からライン(34)とライン(35)の間に注入される分と、ライン(33)を経てサンプリング部(SL)中の成分を移動相(L₁)と共に押し出す分とに分配されるようになっているので、例えばバイパス(BP)に流量調節バルブ(CV)などを設けて、その開閉度を変えるようにしてやれば、容易に移動相希釈液(L₂)の注入量を調節することができる。また、希釈液(L₂)は目的成分をトラッピングカラム(TC)に捕捉させると共に、分離セクション(1)で用いた移動相(L₁)中のバッファーを取り除くことを目的とするものであって、例えば逆相系では一般に水などが使用でき、順相系では一般に炭化水素やハロゲン化炭化水素(例えばヘキサン、クロロホルム等)などが使用できる。

しかして、希釈されてライン (35) を通過した成分と移動相は六方バルブ (V₄) を経由してライン (36) からトラッピングカラム (TC) に送り込まれ、トラッピングカラム (TC) において成分が捕捉される。そして、移動相 (L₁) と移動相希釈液 (L₃) の混合液はトラッピングカラム (TC) を通過して、ライン (37) 及び六方バルブ (V₄) を経由し、排出ドレイン (DR₂) から排出される。

こうしてトラッピングカラム (TC) に集められた成分は、六方バルブ (V₄) を切り換えてライン (38) とライン (37) を連通させ、この状態でポンプ (P₂) で移動相 (L₂) をライン (38) に送り込み、バルブ (V₄) を経てライン (37) からトラッピングカラム (TC) に逆の方向から移動相を送り込むことによって、ライン (36)、六方バルブ (V₄) 及びライン (39) を介して質量分析計 (MS) に送り込まれ、分析される。

従って、以上の手段によれば分離セクション

(1) で用いた第1の移動相 (L₁) を排除し、セクション (2) において第2の移動相で成分を質量分析計 (MS) に導入するようしている、分離するのに成分に応じた最適な第1の移動相が選択でき、バッファーやマトリックスも自由に選択して添加できる。

しかして、第1図に示すように、セクション (2) において更に分離カラム (C₂) を設け、このカラム (C₂) で再度各成分に分離して検出器 (D₂) で検出し、質量分析計 (MS) で質量分析するように構成すれば、セクション (1) で目的成分の分離が充分にできなかったような場合であっても、分離カラム (C₂) で更に分離を行うようにすることにより、より精度の高い質量分析ができるようになり、分析の信頼度が向上する。また、実験の結果、このようにセクション (2) に分離カラム (C₂) を設ける場合には、ライン (36) を他のラインよりも内径の太い管で構成すると、更に分離カラム (C₂) による分離が良好に行われることも分かった。

なお、各ポンプの稼働やバルブの切り換え等はコンピュータ制御が可能であり、また容器 (F₁) (F₂) やポンプ (P₁) (P₂) の数をもっと増やして何種類もの移動相の中から適宜選択するようにして、本装置の汎用性を更に向上させることができる。また、目的に応じて分離カラム (C₁) には大型カラムを使用したり、質量分析計 (MS) がフリット F A B 方式のものである場合などは分離カラム (C₂) にはセミマイクロボアカラム (通常のカラムは内径が 4.0~6.0mm 程度、長さが 10~30cm 程度であるのに比べて、内径が 2.0~3.0mm 程度、長さが 10~30cm 程度のカラム) やマイクロボアカラム (内径が 0.3~1.2mm 程度、長さが 10~30cm 程度のカラム) を使用すると良い。

また、セクション (1) とセクション (2) の分離モードを換えることにより、更に分離効果が発揮でき、D 体と L 体の分離もできるようになる。

(実験例)

ここで、本発明者らが行った実験の結果を示す。

実験 1

トコフェロールの同族体 α 、 β 、 γ 、 δ 各々 10 μ g を含有する試料を使用し、分離セクション (1) において、カラム (C₁) は Inertsil ODS-2 (4.6 ϕ \times 150mm ガスクロ工業 (株) 製)、移動相はメタノール、検出は UV 275nm、流量 1.0ml/min の条件とし、セクション (2) において、カラム (C₂) は Inertsil ODS-2 (0.7 ϕ \times 150mm ガスクロ工業 (株) 製)、移動相は 0.5% グリセロールを含有するメタノール、検出は UV 275nm、流量 0.02 ml/min の条件とした。

そして、移動相希釈液 (L₃) は 0.5% グリセロールを含有するメタノール・水の混合液 (10:90)、流量 0.5ml/min、トラッピングカラム (TC) は Inertsil ODS-2 (2.1 ϕ \times 50mm ガスクロ工業 (株) 製)、質量分析計 (MS) にフリット F A B 方式を備えた質量分析計 (JE

OL JMS-HX100、日本電子(株)製)とした。

分離セクション(1)において、 α -トコフェロールが分離されて溶出するのを検出器(D_1)でモニターし(第4図参照)、バルブ(V_1)を切り換えてサンプリング部(SL)に採取した。更に希釈液(L_3)を送液し、 α -トコフェロールをトラッピングカラム(TC)で捕捉した後バルブ(V_4)を切り換えてセクション(2)の検出器(D_2)でモニターし(第5図)、質量分析計(MS)に α -トコフェロールを導入し分析した。この分析で得られたマススペクトログラムを第6図に示した。この第6図から解るように α -トコフェロールの分子イオンピーク430を感度良く測定できた。

別に、分離セクション(1)において、移動相に1.25%のリン酸を添加し、質量分析を行ったところ、不揮発性バッファーであるリン酸を添加したことによる影響はみられず α -トコフェロールの分子イオンピーク430を感度良く測定できた(第7図)。

質量分析計に送れることが分かった。

即ち、本発明のようにセクション(2)におけるカラム(C_2)を設けた場合には、検出器(D_2)のモニターの様子は第8図のようになって、成分が通過した場合に顕著にシャープなピークを示す結果が得られた。これに対して、分離カラム(C_2)を設けずに、トラッピングカラム(TC)から検出器(D_2)に成分を直接送るようにした場合には、検出器(D_2)のモニターの様子は第9図のようになり、成分は幅広いピークを示す結果となった。

以上のようにしてカラム(C_2)を設けることにより、成分はカラム(C_2)により濃縮され、質量分析計に導入されるため、カラム(C_2)は感度向上に重要な役割を果たすことが分かった。

実験3

α 、 β 、 δ トコフェロール各々1 μ gをトラッピングカラム(TC)で同時に捕捉し、セクション(2)のカラム(C_2)で分離を行った。なお、セクション(2)において、カラム(C_2)

以上のように、質量分析に必要なイオン化を抑制するリン酸のような不揮発性バッファーを用いても本装置では影響なく質量分析ができた。

実験2

α -トコフェロール1 μ gをトラッピングカラム(TC)で捕捉し、セクション(2)の(分離)カラム(C_2)の有無の影響について検討を行った。

なお、セクション(2)において、カラム(C_2)はInertsil ODS-2(0.7 ϕ ×150mmガスクロ工業(株)製)、移動相(L_2)はメタノール、検出はUV 282nm、流量0.02ml/minの条件とし、移動相希釈液(L_3)はメタノール・水の混合液(30:70)、流量1.0ml/min、トラッピングカラム(TC)はInertsil ODS-2(4.0 ϕ ×10mmガスクロ工業(株)製)とした。

この結果、本発明のようにトラッピングカラム(TC)で成分を捕捉してから、移動相(L_2)でカラム(C_2)を設けたセクション(2)に送るように構成すると、濃縮された状態で成分を

C_2)はInertsil ODS-2(0.7 ϕ ×150mmガスクロ工業(株)製)、移動相(L_2)はメタノール、検出はUV 275nm、流量0.02ml/minの条件とし、移動相希釈液(L_3)はメタノール・水の混合液(30:70)、流量1.0ml/min、トラッピングカラム(TC)はInertsil ODS-2(4.0 ϕ ×10mmガスクロ工業(株)製)とした。

また、ラインの内径を0.1 ϕ mmとして装置を構成し、実験を行った。

分離セクション(1)で溶出させた α 、 β 、 δ トコフェロールを、バルブ(V_1)を切り換えずにサンプリング部(SL)の同じループに、わざと混ぜて採取した。こうして、 α 、 β 、 δ トコフェロールが混ざった状態でトラッピングカラム(TC)で捕捉し、バルブ(V_4)を切り換えてセクション(2)のカラム(C_2)で分離を行った。

以上のようにしてカラム(C_2)で α 、 β 、 δ トコフェロールが分離される様子を検出器(D

2)でモニターしたところ、第10図の曲線(45)のようになり、カラム(C₂)で α 、 β 、 δ トコフェロールのそれぞれに分離されたことが分かった。この結果、セクション(1)で目的成分の分離が十分にできなかったような場合でも、セクション(2)に設けた分離カラム(C₂)で更に分離を行うように構成することにより、分離度の高い、精度の良い質量分析ができ、分析の信頼度が向上することが分かった。

実験4

また、セクション(2)に設けた分離カラム(C₂)の内径を0.4 ϕ ×150mmと小さくした場合において、ライン(36)の管の内径と分離した関係について検討した。

α 、 β 、 δ トコフェロール各々1 μ gをトラッピングカラム(TC)で同時に捕捉し、セクション(2)のカラム(C₂)で分離を行った。なお、セクション(2)において、カラム(C₂)はInertsil ODS-2(0.4 ϕ ×150mmガスクロ工業(株)製)、移動相(L₂)はメタノール

エタノール(80:20)、検出はUV282nm、流量0.01 ml/minの条件とし、移動相希釈液(L₃)はメタノール・水の混合液(30:70)、流量1.0ml/min、トラッピングカラム(TC)はInertsil ODS-2(4.0 ϕ ×10mm ガスクロ工業(株)製)とした。

ラインの内径を全て0.1 ϕ mmのステンレス管で構成した場合に、分離カラム(C₂)で成分が分離されている様子を検出器(D₂)でモニターしたところ、第11図の曲線(46)のような結果になり、各成分の分離が不充分であったが、ライン(36)のみに内径0.8 ϕ ×100mmの管を使用し、他のライン(37)および(39)を内径0.1 ϕ mmのステンレス管で構成してモニターしたところ、第12図に示すように、各成分は良好な分離が得られた。この結果、ライン(36)を他のラインよりも内径の太い管で構成すると、更に分離カラム(C₂)による分離が良好に行われることが分かった。

なお、この理由は実験3のように分離カラム

(C₂)の内径を小さくした場合には、分離が不充分であるが、ライン(36)の内径を太くすると、ライン(36)内で分離に適したグラデーション効果が生じているものと考えられる。

実験5

本発明のように、カラム(C₁)とカラム(C₂)は各々の分離に最適な移動相が選択でき、両者の間において分離モードの異なったカラムが分離分析しようとする物質に合わせて適宜選択することが出来る。

ベラバミルを含有する血漿中の試料に対し、カラム(C₁)に逆相モード、カラム(C₂)に光学分割モードのカラムを各々使用し、カラム(C₁)にてベラバミルを分離し、更にカラム(C₂)でベラバミルの光学異性体の分離を行った。分離セクション(1)において、カラム(C₁)はInertsil ODS-2(4.6 ϕ ×150mm ガスクロ工業(株)製)、移動相は5mM 1-ペンタンスルホン酸ナトリウムを含むアセトニトリル:水(3:7、PH3.0)、検出はUV230nm、流量1.

0ml/minの条件とし、セクション(2)において、カラム(C₂)はウルترون(ULTRON)ES-0VM(4.6ID×150mm信和化工製)、移動相は20mMリン酸二水素カリウムを含むテトラヒドロフラン:エタノール:水(1:8:91)、検出はUV230nm、流量1.0ml/minの条件とした。

そして、移動相希釈液(L₃)は5mMリン酸二水素カリウム・リン酸二水素カリウム(pH7.5)、流量4.0ml/min、トラッピングカラム(TC)はウルترون(ULTRON)ES-0VM(1.0mm×4.0mmID信和化工製)とした。

実験1と同様に、分離セクション(1)において、検出器(D₁)によりベラバミルが分離されて溶出される様子をモニターし、バルブ(V₁)を切り換えてサンプリング部(SL)に採取した。第13図のクロマトグラム(40)は検出器(D₁)のモニター状態を表しており、ベラバミルが検出されたことを示している。

こうしてベラバミルを採取した後、希釈液

(L₂)を送液して、ベラバミルをトラッピングカラム(TC)で捕捉し、その後、バルブ(V₄)を切り換えてセクション(2)のカラム(C₂)で再度分離を行った。

以上のようにしてカラム(C₂)でベラバミルが再び分離される様子を検出器(D₂)でモニターしたところ、第13図のクロマトグラムのようになり、この曲線を分析した結果、ピーク(43)でベラバミルのL体が分離され、ピーク(44)でベラバミルのD体が分離されていることが分かった。

実験2、3及び5をにおいて、カラムC₂を設置することは感度が向上し、精度のよい分析ができることや、D体とL体の分離ができるなど、このシステムに於いて重要な役割を果たすことがわかった。

また、実験4において、ライン(36)を他のラインよりも内径の太い管で構成すると、更に分離が良好に行われることがわかった。

(発明の効果)

また、サンプリング部からトラッピングカラムの間に移動相希釈バイパスのラインを設け、移動相の希釈率を調節できるように構成することにより、希釈率を成分に応じた最適な値に調整でき、トラッピングカラムで成分を捕捉しやすくなる。

加えて、分離セクションで目的成分の分離が充分できないような場合であっても、質量分析計に導入するセクションに更にカラムを設けて分離を行うことにより、より精度の高い質量分析ができるようになり、分析の信頼度の向上が図れる。また、これら2つのカラムの組合せによって、成分をD体とL体に分離することもできるようになる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明装置の一例を示す全体図、第2図は六方バルブの説明図、第3図はサンプリング部の説明図、第4、5図は実験1の結果を示すクロマトグラム、第6、7図は同マススペクトルグラム、第8、9図は実験2の結果を示

す以上何れにしても、本発明によれば分離しようとする成分に最適な移動相をオンラインで自由に選択できるので、従来分析できなかった成分も分析できるようになる。しかも、各バルブ、ポンプ等は任意に制御可能であり、操作性は極めてよい。

また、分離セクションで分取した試料中の成分をサンプリング部に貯溜し、トラッピングカラムで濃縮して質量分析計にオンラインで導入できるので、不安定な成分でも分解させないで質量分析できる。

また、大型のサンプリング部を用いたり、或は複数回試料を注入して目的成分をトラッピングカラムで濃縮するようにすることにより、試料中に微量しか存在しない成分でも充分な量採取して質量分析することができる。

そして、分離した成分をサンプリング部で成分毎に異なるループに貯溜することにより、多数の成分を含んでいる試料も一つの装置で同時に分析できるようになる。

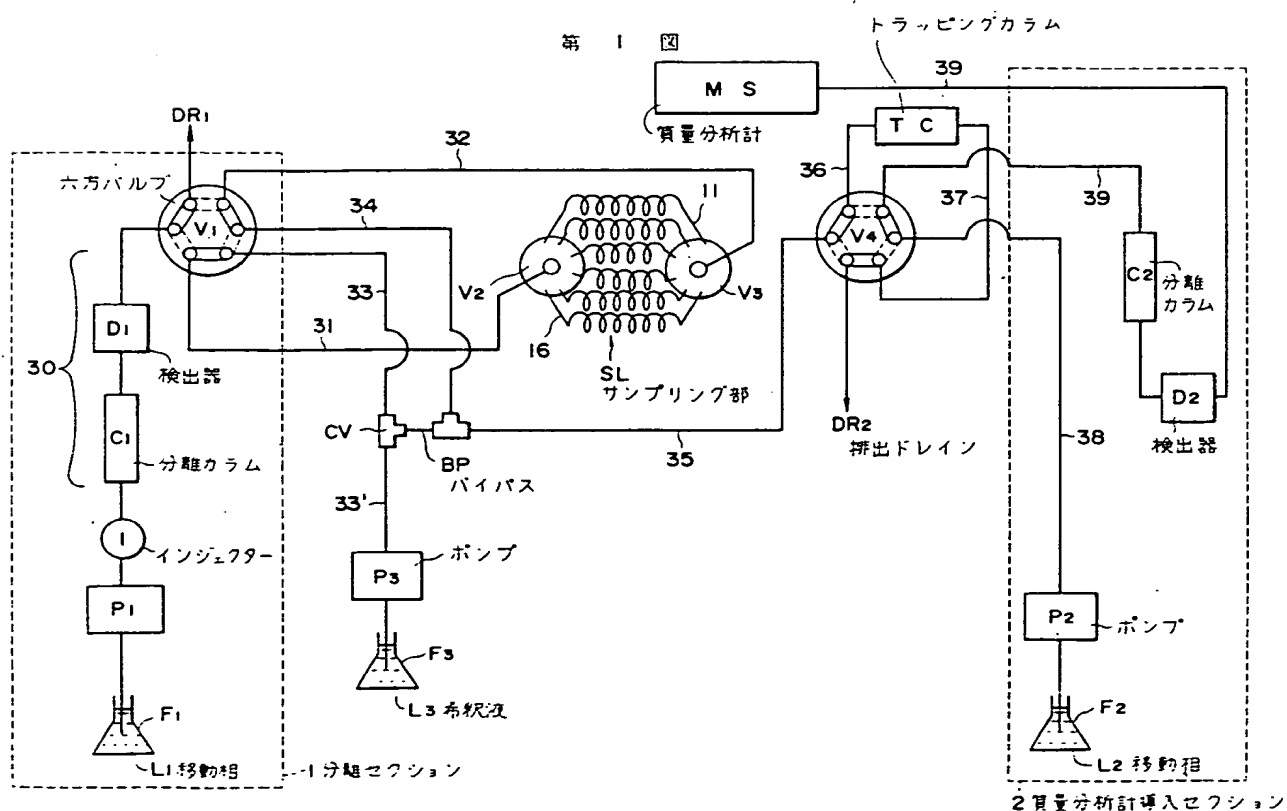
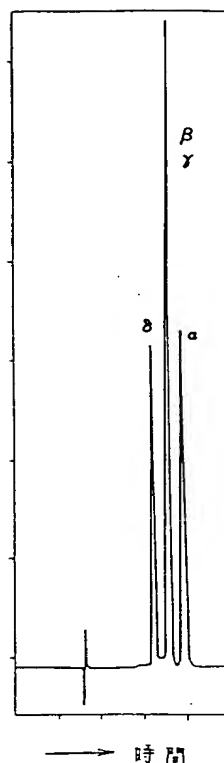
すクロマトグラム、第10図は実験3の結果を示すクロマトグラム、第11、12図はライン(36)の内径を細くした場合と太くした場合とを比較するクロマトグラム、第13図は実験5の結果を示すクロマトグラム、第14図は従来の高速液体クロマトグラフィーの説明図である。

- 1…分離セクション
- 2…質量分析計への導入セクション
- C…分離カラム
- D…検出器
- DR…ドレイン
- F…容器
- I…インジェクター
- P…ポンプ
- L…移動相
- MS…質量分析計
- SL…サンプリング部
- TC…トラッピングカラム

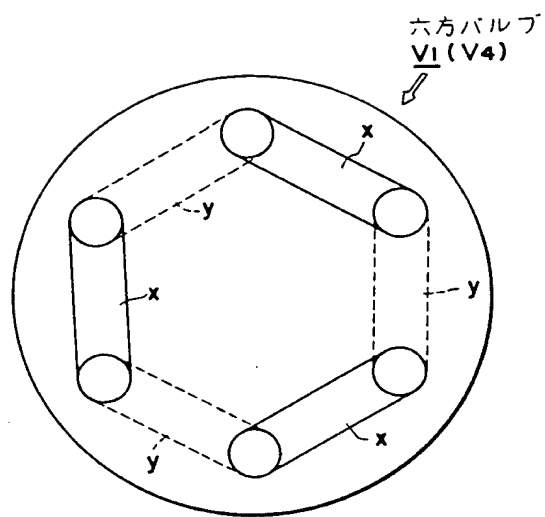
V ... バルブ

第 4 図

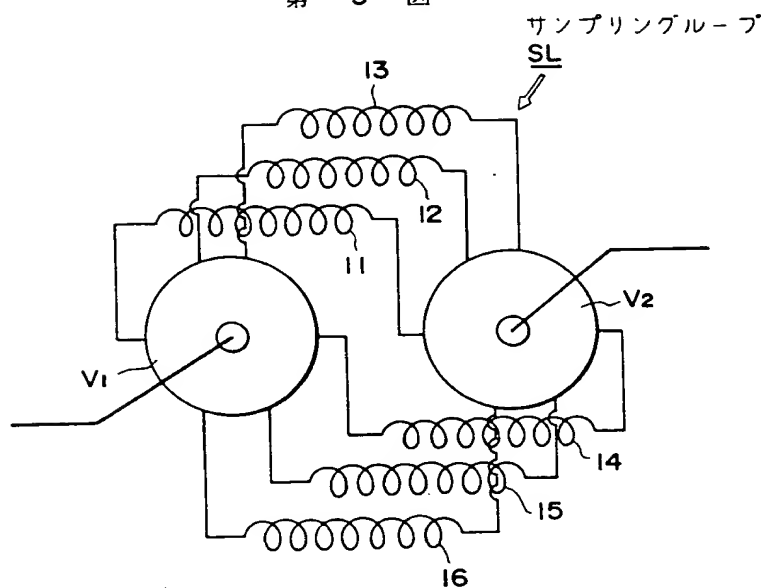
出願人 エーザイ株式会社
代理人 渡 辺 敏
同 渡 辺 敏



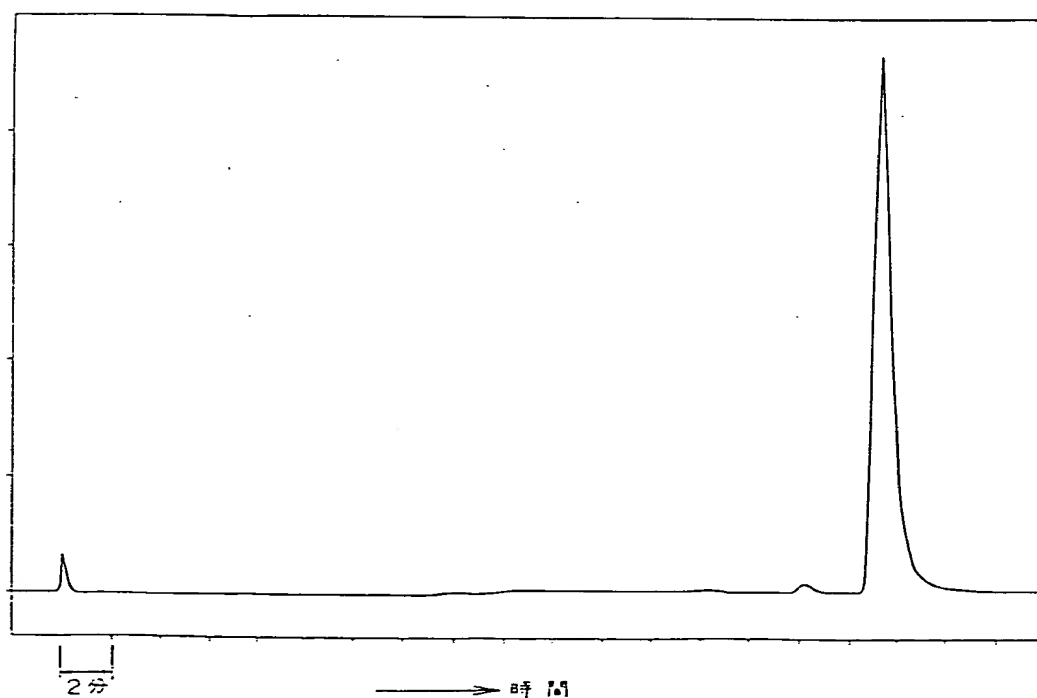
第 2 図



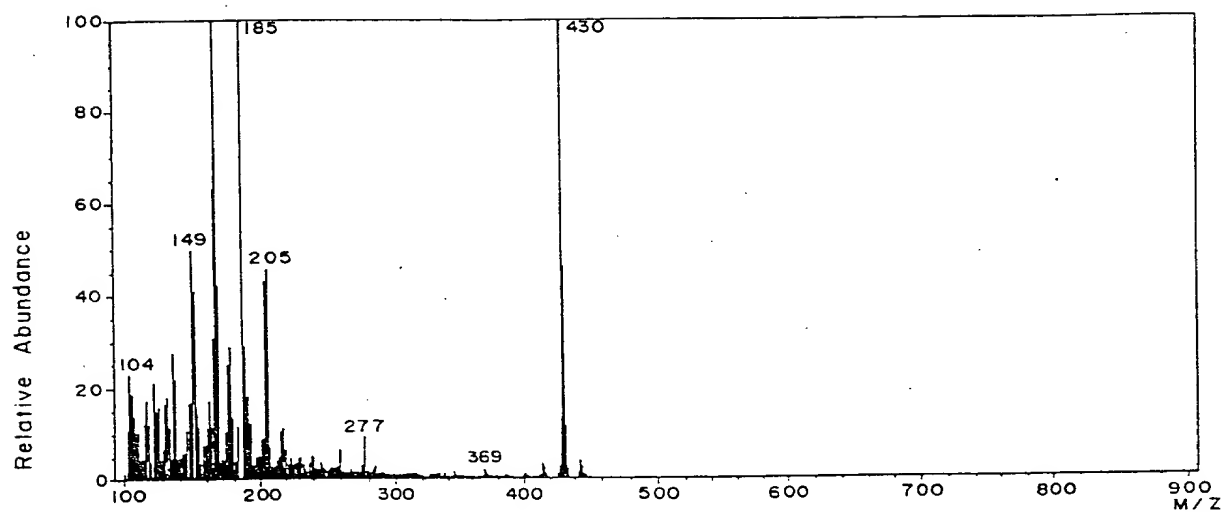
第 3 図



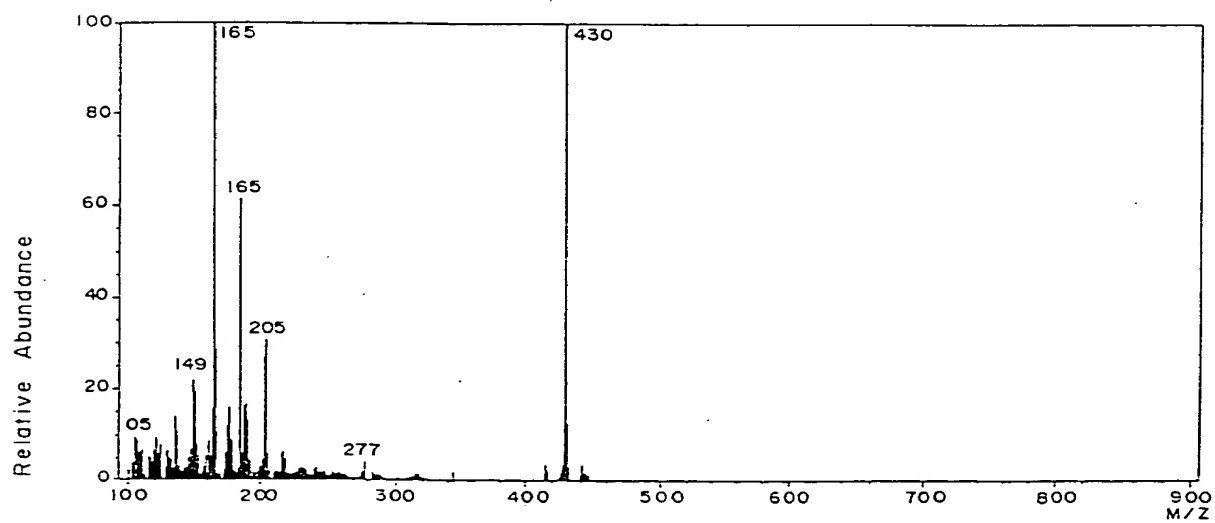
第 5 図



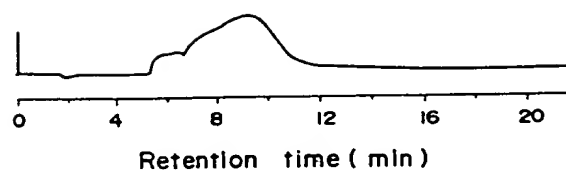
第 6 図



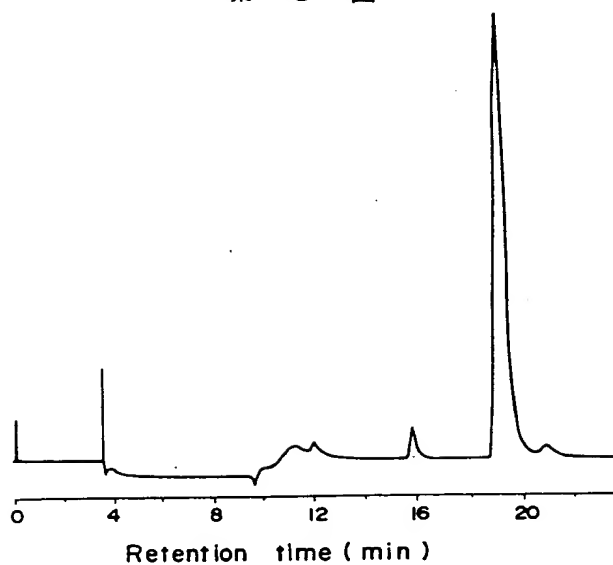
第 7 図



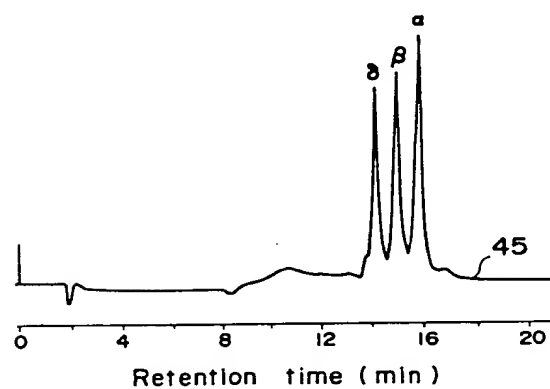
第 9 図



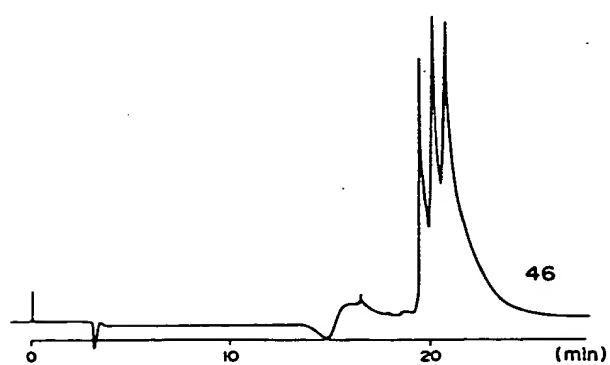
第 8 図



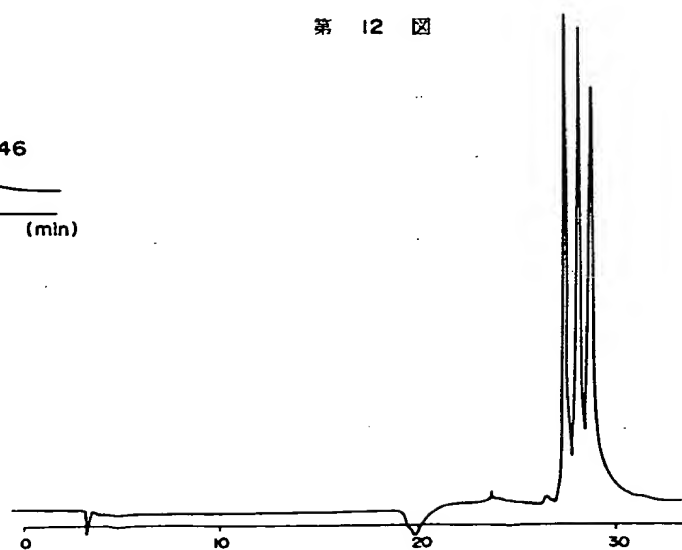
第 10 図



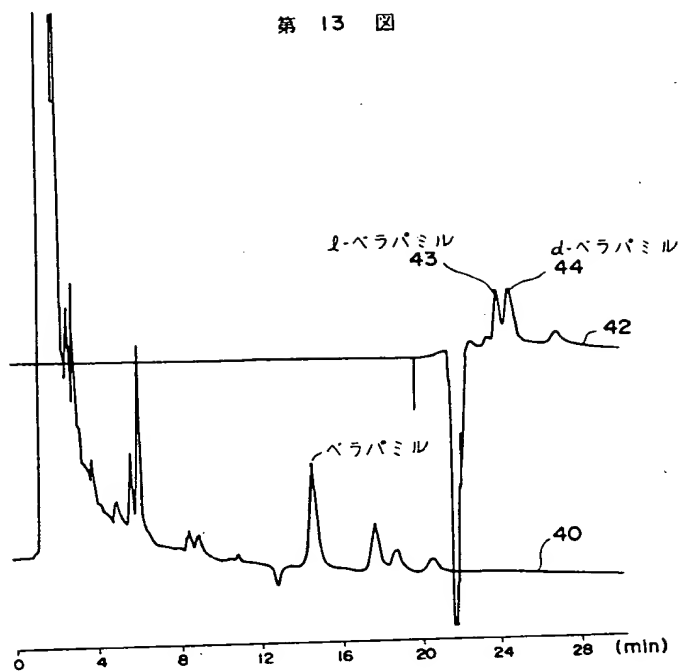
第 11 図



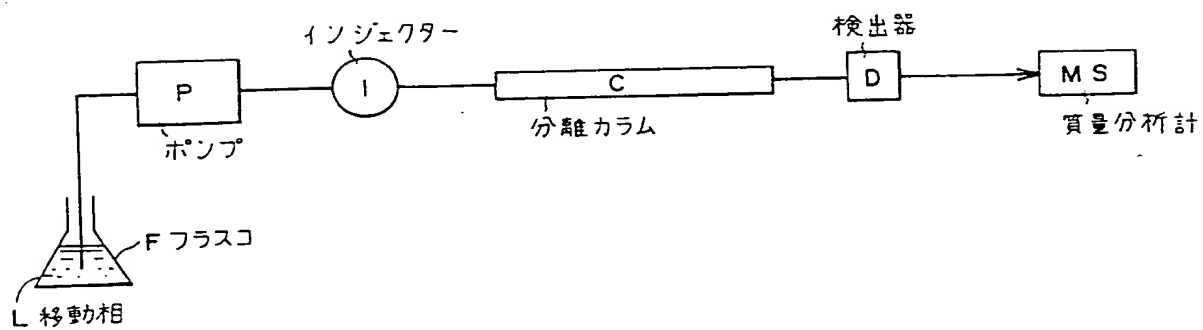
第 12 図



第 13 図



第 14 図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☒ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.